
遺伝子発現調節及び光合成装置の構築に
果たす分子シャペロンの役割

16570028

平成 16 年度~平成 17 年度科学研究費補助金
(基盤研究(C)(2)) 研究成果報告書

平成 18 年 5 月

研究代表者 仲本 準

埼玉大学理学部助教授

埼玉大学図書館



206801889

<はしがき>

分子シャペロンは、リボソームで合成された直後の新生ポリペプチドの折れたたみ (folding) や集合 (assembly)、変性タンパク質の再生などを介助する。ポリペプチドやその複合体が天然あるいは成熟した構造に至る途上で、本来は分子内部や分子間相互作用部位に折り込まれていた疎水性アミノ酸残基が分子表面に露出し凝集しやすくなる。このような疎水性部分に分子シャペロンが一過的に結合して、正しい折れたたみや (分子) 集合に導く。高温などのストレス下では熱ショックタンパク質 (HSP) として著しく誘導されて、変性タンパク質の不可逆的凝集阻止や天然の構造への再生、あるいはプロテアーゼとして変性タンパク質の分解に関与すると考えられている。本研究は、シアノバクテリアにおける分子シャペロンあるいは HSP の、以下に示すような広範な細胞機能の解明を主目的とした。

(1) 新規な HSP、Orf7.5 の遺伝子発現調節に果たす役割の解明

orf7.5 遺伝子は、我々がシアノバクテリア *Synechococcus* sp. PCC7942 から初めてクローニングした新規な HSP 遺伝子である。海洋性シアノバクテリア *Prochlorococcus* 属のゲノムに相同な配列が存在することが最近明らかにされた。分子遺伝学的手法を用いることで、我々は Orf7.5 が *groESL* オペロンの転写を活性化する正の転写調節因子であることを示唆する結果を得た。本研究では *groESL* オペロンの転写調節に果たす Orf7.5 の機能を明らかにすることを目的とした。Orf7.5 によるシアノバクテリア遺伝子発現調節機構の解明はシアノバクテリアのみならず広く原核生物における新規な遺伝子発現調節の発見をもたらすものと期待される。

(2) 光合成集光装置フィコビリソームのストレス条件下における安定化や、この超分子の構築に果たす低分子量 HSP や HtpG などの分子シャペロンの役割解明

In vitro における実験からフィコビリソームの形成は自動的に起こると考えられているが、単一のポリペプチドの折れたたみから複数のポリペプチドの集合にいたるまで分子シャペロンの働きが極めて重要であることが明らかになってきた最近の知見を背景にすると、このような 10 数種のポリペプチドから天然型の巨大な (200 分子以上から成る) タンパク質複合体形成に分子シャペロンが関与しないと考えるのは非現実的である。本研究では、フィコビリソーム構築の各段階において、集合前のポリペプチドの (表面に露出した) 疎水性 (タンパク間) 相互作用部位に一過的に分子シャペロンが結合して間違っただ凝集を抑制し正しい構築に導くと仮定する。本研究は、フィコビリソーム複合体の構築に果たす分子シャペロンの役割解明への道を開くものとする。

(3) 光合成装置構成ポリペプチドや色素の生合成に果たす HtpG の役割解明

大腸菌や枯草菌にも *htpG* 遺伝子が存在するが、欠損しても致死とはならないし、高温における生育や生存率に顕著な変化が生じない。変異株の表現型が現れないために HtpG の機能は不明であった。しかし、我々は *htpG* 遺伝子の破壊によって *Synechococcus* sp. PCC7942 が高温などのストレスに著しい感受性を示すことを明らかにし、HtpG がストレス条件下で重要な働きをすることを明らかにした。

東京農業大学の吉川博文教授らは酵母二ハイブリッド法を用いて PCC7942 株の HtpG と Uroporphyrinogen decarboxylase が相互作用することを明らかにした。この酵素はヘム合成経路の酵素で、活性酸素消去に関わる catalase や peroxidase などのヘム含有酵素の合成のみならず、phycocyanobilin やクロフィル合成にも重要な働きをしている。これらの結果から HtpG が上記酵素との相互作用を介してヘム合成系を調節することによりシアノバクテリアの光合成機能を広範に調節するのではないかと考えた。

真核生物の細胞の増殖や分化において必須の機能を果たす HSP90 の祖先遺伝子は HtpG である。この点で、原核から真核生物にいたるまで最も基本的な反応（例えば電子伝達）に関与するヘムの合成経路における HtpG の機能に焦点をあてることは、HtpG のみならず Hsp90 の細胞機能を明らかにする上でも重要である。

研究成果は後に示すように国際的な学術雑誌や国内外の学会・研究会等で既に発表した。なお、これら以外にも現在論文投稿準備中の成果を得ているので、それらを以下に簡単に記す。

(1) 新規な HSP、Orf7.5 の機能解明

酵母二ハイブリッド法で、*Synechococcus* sp. PCC7942 株の主要シグマ因子 RpoD1 と Orf7.5 とが特異的に相互作用することを示唆する結果を得た（東京農業大学吉川博文教授との共同研究）。さらに Orf7.5 と RNA ポリメラーゼコア酵素の β サブユニットが直接相互作用することをファーウェスタン法で明らかにした。

PCC7942 株から精製した RNA ポリメラーゼコア酵素、精製 Orf7.5 と RpoD1、それに鋳型として *groESL1* オペロンのプロモーター領域を含む DNA 断片を用いてラン・オフ *in vitro* 転写解析を行い、Orf7.5 が *groESL1* プロモーターの転写活性を増加させること、熱処理下ではその効果が倍増することを明らかにした（東京大学田中寛助教授との共同研究）。

(2) 光合成集光装置フィコビリソームのストレス条件下における安定化や、この超分子の構築に果たす低分子量 HSP や HtpG などの分子シャペロンの役割解明

通常温度で培養した *htpG* 遺伝子破壊株細胞から単離したフィコビリソームを野生株のそれと比較すると、30 kDa リンカー (linker) ポリペプチドが著しく減少していた。同様の結果は、変異株と野生株の全細胞抽出液でも得られた。リンカーポリペプチドはフィコビリソーム構造の骨格をなすと考えられている。これらの結果から、HtpG は非常に不安定で凝集しやすいリンカーポリペプチドを安定化する分子シャペロンとして機能し、フィコビリソームの構築に重要な役割を果たすのではないかと仮定した。この仮説を実証するために、PCC7942 株の HtpG と 30 kDa リンカーポリペプチドを大腸菌で大量発現後、精製し、これらを用いて種々の生化学的解析を行なった。その結果、HtpG がリンカーポリペプチドと特異的に相互作用することが明らかになった。

(3) 光合成装置構成ポリペプチドや色素の生合成に果たす HtpG の役割解明

Uroporphyrinogen decarboxylase を大腸菌で大量発現して精製した。この酵素が 2 量体を形成することと、これが活性を有することを明らかにした。今後、この酵素と HtpG の特異的相互作用の生化学的解析を進めていく予定である。

2004 年にスイスで開催された第 2 回 Hsp90 国際会議で HtpG の標的タンパク質 (リンカーポリペプチドと Uroporphyrinogen decarboxylase) に関する発表 (Identification of HtpG interacting targets in cyanobacteria) を口頭で行い高い評価を得た。我々の発表については、この会議録が掲載された *Nature Structural & Molecular Biology* (Vol. 11, p.1155, 2004) に詳しく紹介されている。

研究組織

研究代表者：仲本 準 (埼玉大学理学部助教授)

交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 16 年度	1,900,000	0	1,900,000
平成 17 年度	1,800,000	0	1,800,000
総計	3,700,000	0	3,700,000

研究発表

(1) 学会誌等

1.

Asadulghani, K. Nitta, Y. Kaneko, K. Kojima, H. Fukuzawa, H. Kosaka, and H. Nakamoto.

Comparative analysis of *hspA* mutant and wild type *Synechocystis* sp. PCC 6803 under salt stress: Evaluation of the role of *hspA* in salt stress management.

Archives of Microbiology

182 (6): 487-497

2004.

2.

Kojima, K. and H. Nakamoto.

Constitutive expression of small heat shock protein in an *htpG* disruptant of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942.

Current Microbiology

50(5):272-276

2005.

3.

Nitta, K., N. Suzuki, D. Honma, Y. Kaneko and H. Nakamoto.

Ultrastructural stability under high temperature or intensive light stress conferred by a small heat shock protein in cyanobacteria.

FEBS Letters

579 (5): 1235-1242

2005.

4.

Kojima K. and H. Nakamoto

Post-transcriptional control of the cyanobacterial *hspA* heat-shock induction.

Biochemical Biophysical Research Communications

331 (2): 583-588

2005.

5.

Kaneko, Y., R. Danev, K. Nagayama and H. Nakamoto

Intact Carboxysomes in a cyanobacterial cell visualized by Hilbert differential contrast transmission electron microscopy

Journal of Bacteriology

188 (2): 805-808

2006.

6.

Nakamoto, H. and D. Honma

Interaction of a small heat shock protein with light-harvesting cyanobacterial phycocyanins under stress conditions.

FEBS Letters 印刷中

2006.

7.

Kojima K., T. Suzuki-Maenaka, T. Kikuchi and H. Nakamoto.

Roles of the cyanobacterial *isiABC* operon in protection from oxidative and heat stresses.

Physiologia Plantarum 印刷中

2006.

8.

Nakamoto, H. and L. Vigh

The small heat shock proteins: An insolubilized solution under stress (invited review)

Cellular and Molecular Life Sciences 発表予定

2006.

(2) 口頭発表等

1.

本間大奨、仲本準

「フィコビリソーム複合体の構築・分解に果たす分子シャペロンの役割」

第4回日本光合成研究会シンポジウム (東京工業大学)

2004.5.28 - 5.29

2.

小島幸治、仲本準

「フィコビリソーム複合体の構築・分解に果たす分子シャペロンの役割」

第4回日本光合成研究会シンポジウム（東京工業大学）

2004.5.28 - 5.29

3.

Kouji Kojima, Hitoshi Nakamoto

‘Both CP43’ and Flavodoxin Play a Role in Protection from Heat and Oxidative Stresses’

13th International Congress of Photosynthesis (Quebec, カナダ)

2004.8.29 - 9.3

4.

Hitoshi Nakamoto

‘The molecular chaperones and the heat-shock response in cyanobacteria’

Christian de Duve Institute of Cellular Pathology (Brussels, ベルギー)

2004. 9.24

5.

Hitoshi Nakamoto, Erika Kojima, Daisuke Honma, Satoru Watanabe, Hirofumi Yoshikawa

‘Identification of HtpG interacting targets in cyanobacteria’

EMBO workshop and 2nd International Conference on The Hsp90 Chaperone Machine (Gwatt, スイス)

2004.9.25 - 9.29

6.

Aurore Caruso, Hitoshi Nakamoto, Pierre Goloubinoff

‘Hsp90 and HtpG: Are they true molecular chaperones?’

EMBO workshop and 2nd International Conference on The Hsp90 Chaperone Machine (Gwatt, スイス)

2004.9.25 - 9.29

7.

渡辺智、斉藤勝和、仲本準、吉川博文

「シアノバクテリア *Synechococcus.sp.*PCC7942株におけるHtpGタンパク質の新規機能解析」

微生物研究会第2回セミナー（立教大学）

2004.10.23

8.

仲本準、本間大奨、佐藤壮志

「光合成色素タンパク質複合体フィコビリソームと分子シャペロンの相互作用」

特定領域研究「タンパクの一生」平成16年度班会議（シーガイア宮崎国際会議場）

2004.10.26 - 10.29

9.

仲本準、新田浩二、鈴木伸章、本間大奨、金子康子

「シアノバクテリア低分子量分子シャペロンによる、高温及び強光ストレス下における細胞微細構造の安定化」

第27回日本分子生物学会年会（神戸ポートアイランド）

2004.12.8 - 12.11

10.

齋藤勝和、渡辺智、小島幸治、佐藤真純、松根（荷村）かおり、吉川博文、仲本準

「シアノバクテリア *Synechococcus sp.* PCC 7942における *groESL1* の発現調節」

第27回日本分子生物学会年会（神戸ポートアイランド）

2004.12.8 - 12.11

11.

仲本準、佐藤壮志

「シアノバクテリアの分子シャペロンHtpGとフィコビリソームリンカーポリペプチドとの特異的相互作用」

日本植物生理学会2005年度年会（新潟コンベンションセンター朱鷺メッセ）

2005.3.24 - 3.26

12.

小島幸治、仲本準

「シアノバクテリア *groEL* 遺伝子の HrcA リプレッサーに媒介されない熱ショックおよび光に応答した転写調節」

日本植物生理学会2005年度年会（新潟コンベンションセンター朱鷺メッセ）

2005.3.24 – 3.26

13.

本間大奨、仲本準

「シアノバクテリア低分子量熱ショックタンパク質によるフィコビリソームの変性凝集阻止」

日本植物生理学会2005年度年会（新潟コンベンションセンター朱鷺メッセ）

2005.3.24 – 3.26

14.

渡辺智、斉藤勝和、仲本準、吉川博文

「シアノバクテリア *Synechococcus* sp. PCC7942 における HtpG タンパク質によるポルフィリン合成制御機構の解析」

日本植物生理学会2005年度年会（新潟コンベンションセンター朱鷺メッセ）

2005.3.24 – 3.26

15.

渡辺智、斉藤勝和、仲本準、吉川博文

「シアノバクテリア *Synechococcus* sp. PCC7942 株における HtpG タンパク質によるポルフィリン合成制御機構の解析」

微生物研究会第3回セミナー（埼玉大学）

2005.4.23

16.

仲本準、佐藤壮志

「シアノバクテリアの分子シャペロン HtpG とフィコビリソームリンカーポリペプチドとの特異的相互作用」

微生物研究会第3回セミナー（埼玉大学）

2005.4.23

17.

斉藤勝和、渡辺智、吉川博文、仲本準

「シアノバクテリア *Synechococcus* sp. PCC7942 における *groESL* オペロンの Orf7.5

及びHrcAによる転写調節」

微生物研究会第3回セミナー（埼玉大学）

2005.4.23

18.

Hitoshi Nakamoto

‘Interaction between molecular chaperones and photosynthetic machineries in cyanobacteria’

ESF Research Conference 2005. IVth Euroconference on the Molecular Bioenergetics of Cyanobacteria. (San Feliu de Guixols, スペイン)

2005.5.21 – 5.26

19.

Yasuko Kaneko, Radostin Danev, Koji Nitta, Hitoshi Nakamoto, Kuniaki Nagayama

‘Cyanobacterial subcellular structures visualized by Hilbert differential contrast transmission electron microscopy’

第 58 回日本細胞生物学会大会（大宮ソニックシティ）

2005.6.15-6.17

20.

Hitoshi Nakamoto, Daisuke Honma, Takeshi Sato

‘Stabilization of phycobilisome polypeptides by molecular chaperones: implications of molecular chaperones in the biogenesis of phycobilisome structures’

International Symposium on the Genomics of Marine Phytoplankton. (Station Biologique de Roscoff, フランス)

2005.7.8 – 7.11

21.

仲本準

「フィコビリソームの安定化、構築、分解に果たす分子シャペロンの役割」
ラン藻ゲノム研究交流会（東京大学）

2005.7.30

22.

仲本準、佐藤壮志、本間大奨、金子康子

「集光性超分子フィコビリソームの構造形成における分子シャペロンの機能」

特定領域研究 生体超分子の構造形成と機能制御の原子機構：平成17年度第一
回ワークショップ（淡路夢舞台国際会議場）

2005.9.8 - 9.10

23.

Hitoshi Nakamoto, Takeshi Sato

‘HtpG plays a role in the assembly of phycobilisomes, the supramolecular
light-harvesting complexes of cyanobacteria’

International Symposium on Life of Proteins～Maturation, Translocation and Quality
Control in the Cell～「タンパク質の一生」国際会議（淡路夢舞台国際会議場）

2005.10.30 - 11. 3

24.

斉藤勝和, 渡辺智, 吉川博文, 仲本準

「シアノバクテリアのURODとHtpGの相互作用」

微生物研究会第4回セミナー（東京農業大学）

2005.11.12

25.

金子康子, 新田浩二, Radostin Danev, 仲本準, 永山國昭

「氷包埋シアノバクテリアの電子顕微鏡観察」

第43回日本生物物理学会年会（札幌コンベンションセンター）

2005.11.23 - 11.25

26.

仲本準, 佐藤壮志

「分子シャペロンHtpGが特異的に相互作用する標的ポリペプチドの同定」

第43回日本生物物理学会年会（札幌コンベンションセンター）

2005.11.23 - 11.25

27.

仲本準, 山岡巧, 岡本直樹, 佐藤壮志

「集光性超分子フィコビリソーム構成ポリペプチドと分子シャペロンの相互作用」

ラン藻の分子生物学（かずさアカデミアホール）

2005.12.5 - 12.6

28.

佐藤慎一郎、仲本準

「好熱性シアノバクテリアにおける *groEL* の転写調節機構の解析」
ラン藻の分子生物学 (かずさアカデミアホール)

2005.12.5 - 12.6

29.

佐藤壮志、仲本準

「分子シャペロン Hsp90 のホモログであるシアノバクテリア HtpG の新規標的タンパク質の同定」

第 28 回日本分子生物学会年会 (福岡ヤフードーム)

2005. 12. 7 - 12.10

30.

渡辺智、小林利彰、斉藤勝和、仲本準、吉川博文

「シアノバクテリア *Synechococcus* sp. PCC7942 における HtpG タンパク質によるポルフィリン合成制御機構の解析」

第 28 回日本分子生物学会年会 (福岡ヤフードーム)

2005. 12. 7 - 12.10

31.

佐藤慎一郎、仲本準

「シアノバクテリアにおけるシャペロニン遺伝子 *groEL* の新規な転写調節機構の解析」

第 28 回日本分子生物学会年会 (福岡ヤフードーム)

2005. 12. 7 - 12.10

32.

仲本準

「集光性超分子フィコビリソームの構築と分解の仕組み」

特定領域研究「生体超分子構造」第 2 回公開シンポジウム (金沢 K K R)

2005.12.12 - 12.13

33.

仲本準

「生きたシアノバクテリアにおけるフィコビリソームなどの超分子を見る」
日本顕微鏡学会関西支部特別講演会 平成 17 年度生理学研究所研究会「位相差
断層電子顕微鏡の医学的・生物学的応用」共催（岡崎コンファレンスセンター）
2006. 1. 26 - 1.27

34.

佐藤慎一郎、森脇義仁、濱田純也、朝井計、仲本準
「シアノバクテリアにおけるグループ 3 σ 因子 SigG の新規ターゲットの同定」
日本植物生理学会 2006 年度年会（筑波大学）
2006. 3. 19 - 3. 21

35.

佐藤壮志、仲本準
「フィコビリソームの骨格構造をなすリンカーポリペプチドとシアノバクテリ
ア Hsp90 (HtpG) との相互作用」
日本植物生理学会 2006 年度年会（筑波大学）
2006. 3. 19 - 3. 21

36.

齋藤勝和、渡辺智、佐藤壮志、小林利彰、吉川博文、仲本準
「シアノバクテリア *Synechococcus* sp. PCC 7942 における HtpG と
Uroporphyrinogen decarboxylase との相互作用解析」
日本植物生理学会 2006 年度年会（筑波大学）
2006. 3. 19 - 3. 21

37.

渡邊達郎、内海宏幸、仲本準
「シアノバクテリア低分子量熱ショックタンパク質の酸化ストレス防御に果た
す役割」
日本植物生理学会 2006 年度年会（筑波大学）
2006. 3. 19 - 3. 21

38.

渡辺智、小林利彰、齋藤勝和、仲本準、吉川博文
「シアノバクテリア *Synechococcus* sp. PCC 7942 における HtpG タンパク質によ
るポルフィリン合成制御機構の解析」

日本植物生理学会 2006 年度年会 (筑波大学)

2006. 3. 19 - 3. 21

(3) 出版物

Kojima, K. and H. Nakamoto.

'Both CP43' and flavodoxin play a role in protection from heat and oxidative stresses'

In: van der Est, A. and Bruce, D., eds., **Photosynthesis: Fundamental Aspects to Global Perspectives**. Vol. 2, pp.709 – 711.

ACG Publishing.

2005.

研究成果

研究成果として、以下の論文等の印刷物をまとめた。

1.

Asadulghani, K. Nitta, Y. Kaneko, K. Kojima, H. Fukuzawa, H. Kosaka, and H. Nakamoto.

Comparative analysis of *hspA* mutant and wild type *Synechocystis* sp. PCC 6803 under salt stress: Evaluation of the role of *hspA* in salt stress management.

Archives of Microbiology

182 (6): 487-497

2004.

2.

Kojima, K. and H. Nakamoto.

Constitutive expression of small heat shock protein in an *htpG* disruptant of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942.

Current Microbiology

50(5):272-276

2005.

3.

Nitta, K., N. Suzuki, D. Honma, Y. Kaneko and H. Nakamoto.

Ultrastructural stability under high temperature or intensive light stress conferred by a small heat shock protein in cyanobacteria.

FEBS Letters

579 (5): 1235-1242

2005.

4.

Kojima K. and H. Nakamoto

Post-transcriptional control of the cyanobacterial *hspA* heat-shock induction.

Biochemical Biophysical Research Communications

331 (2): 583-588

2005.

5.

Kaneko, Y., R. Danev, K. Nagayama and H. Nakamoto

Intact Carboxysomes in a cyanobacterial cell visualized by Hilbert differential contrast transmission electron microscopy

Journal of Bacteriology

188 (2): 805-808

2006.

6.

Nakamoto, H. and D. Honma

Interaction of a small heat shock protein with light-harvesting cyanobacterial phycocyanins under stress conditions.

FEBS Letters 印刷中

2006.

7.

Kojima K., T. Suzuki-Maenaka, T. Kikuchi and H. Nakamoto.

Roles of the cyanobacterial *isiABC* operon in protection from oxidative and heat stresses.

Physiologia Plantarum 印刷中

2006.

8.

Kojima, K. and H. Nakamoto.

'Both CP43' and flavodoxin play a role in protection from heat and oxidative stresses'

In: van der Est, A. and Bruce, D., eds., **Photosynthesis: Fundamental Aspects to Global Perspectives**. Vol. 2, pp.709 – 711.

ACG Publishing.

2005.